Aus dem Städtischen Hygienischen Universitäts-Institut zu Frankfurt am Main

(Direktor: Prof. Dr. Küster)

Über Abtötungs- und Konservierungsversuche mit Nipagin und Nipasol

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt a. M.

vorgelegt von

Angelika Müller
aus Satzung (Erzgebirge)

Februar 1941

Druck: Lengericher Handelsdruckerei, Lengerich i. W.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Seitdem Robert Koch durch die Schaffung seiner Methode der Reinkultur-Züchtung die Bakteriologie auf eine sichere Grundlage stellte, erhielt auch die Lehre von der Desinfektion durch ihn einen gewaltigen Aufschwung. Auf Robert Koch geht auch die genaue Begriffsbestimmung Desinfektion und Sterilisation zurück. Mit Desinfektion bezeichnet man das Unschädlichmachen von lebenden Krankheitserregern, mit Sterilisation die Abtötung aller Mikroorganismen einschließlich der nichtpathogenen Keime. Unter Entwicklungshemmung versteht man die Wirkung der Stoffe, die die Keime vermehrungsunfähig macht, ohne sie zu töten. Dieser Zustand der Vermehrungsunfähigkeit ist zum Unterschied von der Wirkung der Desinfektion reversibel, da es oftmals gelingt, Bakterien, die durch chemische Einwirkung geschädigt, jedoch nicht abgetötet waren, bei guten Ernährungsbedingungen noch zum Wachstum und zur Vermehrung zu bringen.

Die Lebensfähigkeit der Bakterien kann sowohl durch physikalische wie auch durch chemische Mittel beeinflußt bzw. ganz aufgehoben werden. Die einfachste Art, die Bakterien zu vernichten, ist ihre Verbrennung. Auch kann man Keime durch trockene Hitze von 140—160° C. abtöten. Eine besonders keimschädigende Wirkung hat die feuchte Erhitzung mit gesättigtem Wasserdampf über 100° C. Sie bewirkt nach Rubner eine Sprengung der Membran, nachdem das Protoplasma der Zelle Wasser aufgenommen hat. Bei der Austrocknung dagegen ist mikroskopisch eine Schrumpfung der Membran festzustellen.

Diesen physikalischen Keimvernichtungsarten stehen die chemischen Methoden gegenüber. Die chemischen Stoffe, die wir als Desinfektionsmittel bezeichnen, diffundieren durch die Plasmaverdichtung (Membran) in das Protoplasma und verändern die Zellbestandteile, wie z. B. durch Eiweißfällung, derart, daß die Lebensfunktion der Zelle gestört bzw. ganz vernichtet wird.

Die Widerstandsfähigkeit der Bakterienarten gegen Desinfektionsmittel ist ungleich, weil die Bakterien-Membran verschiedene Grade der Durchlässigkeit zeigen kann. So erliegen die vegetativen Formen der Bakterien, z. B. die Typhus-, Paratyphus- und Ruhr-Bazillen sowie Cholera-Vibrionen, schneller den schädigenden Einflüssen der Desinfektionsmittel. Die Staphylokokken mit ihrer grampositiven Membran und die Tuberkelbazillen, durch ihre wachsartige Hülle geschützt, können schon etwas länger widerstehen. Besonders widerstandsfähig sind meistens die Dauerformen der Bakterien, die Sporen, auf Grund der dichteren Struktur ihrer Außenhülle, z. B. Milzbrandsporen.

Es war ein gewaltiger Fortschritt, daß Robert Koch in der Lage war, bei seinen klassischen Desinfektionsmittelprüfungen als erster Reinkulturen von Bakterien zu verwenden. Dadurch gelang es ihm, einwandfrei zu prüfen, wie sich bestimmte Bakterienarten gegen chemische Desinfektionsmittel verhalten. Robert Koch stellte auch die Forderung auf, daß die Keime der zu prüfenden Bakterienart sich in einem guten, kräftigen Wachstumszustande befinden müssen; es dürfen keine geschwächten Keime verwendet werden. Ferner muß die Prüfung, ob das Desinfektionsmittel eine völlige Abtötung bewirkt hat, in einer sogenannten optimalen Nachkultur vorgenommen werden, die auch den im Wachstum nur geschwächten, aber nicht abgetöteten Keimen noch eine Vermehrung gestattet. Es ist weiter festzustellen, in welcher Konzentration und in welcher Zeit das Desinfektionsmittel sicher abtötet. Koch forderte auch von einem guten Desinfektionsmittel, daß es nicht nur die leicht zu tötenden Keime vernichtete, sondern daß es auch die

am schwierigsten abzutötenden Sporen mit Sicherheit tötete. Aus diesem Grunde bediente sich Robert Koch neben Typhusbakterien, Staphylokokken und anderen Arten daher mit Vorliebe der Milzbrandsporen, die, an Seidenfäden angetrocknet, in die zu prüfende Desinfektionsflüssigkeit eingetaucht und nach einer bestimmten Verweildauer herausgenommen und auf feste oder in flüssige Nährböden gebracht wurden. Durch Bebrütung bei 37° C prüfte Koch auf Wachstumsfähigkeit. Diese von Robert Koch angewandten Prüfungsmethoden haben sich bis in die heutige Zeit bewährt. Auch die bei meinen Versuchen benutzte, nach Rideal-Walker benannte Methode ist nur eine unwesentliche Abänderung der Kochschen Grundlagen.

Nach diesem kurzen Überblick über die von Robert Koch entwickelte grundlegende Methode der Desinfektionsmittelprüfung wollen wir sehen, welche Anforderungen an ein gutes Desinfektionsmittel gestellt werden. Croner verlangte folgende Eigenschaften: Hohe Wirkung auch in niedrigerer Konzentration, leichte Wasserlöslichkeit, unbegrenzte Haltbarkeit, geringe Giftigkeit, vollkommene Indifferenz gegenüber den zu desinfizierenden Stoffen und niedrigen Anschaffungspreis.

Alle diese Bedingungen erfüllt bisher noch kein Desinfektionsmittel vollständig, man muß daher auf die eine oder andere dieser Eigenschaften verzichten und nach dem beabsichtigten Zweck ein möglichst geeignetes Mittel auswählen.

Zu den stark wirkenden Desinfektionsmitteln gehören unter anderen: die starken Mineralsäuren, Salzsäure, Salpeter- und Schwefelsäure, die starken Oxydationsmittel, Chlor, Chlorkalk, übermangansaures Kalium, Wasserstoffsuperoxyd, Salze des Silbers und Quecksilbers (Silbernitrat und Sublimat) und organische Mittel (Phenol-Schwefelsäureverbindungen u. a.). Zu den schwächer wirkenden Desinfektionsmitteln zählen: Phenole, Kresole und ihre Derivate sowie Alkohole, Seifen, Formaldehyd u. a.

Die von mir untersuchten Desinfektionsmittel Nipagin und Nipasol sind chemisch als Derivate des Phenols aufzufassen. Die Vertreter der Gruppe der Phenole (Karbolsäure) sind

farblos, besitzen einen charakteristischen, starken Geruch und sind im Wasser begrenzt löslich, jedoch nimmt die Löslichkeit mit steigendem Molekulargewicht ab, in Alkohol lösen sie sich sehr gut. Sie reagieren schwach sauer, und in starken Lösungen wirken sie giftig. Da die Phenole wie auch ihre Lösungen sehr haltbar sind, ist ihre Wirkung gleichmäßig und zuverlässig.

So werden nach Angaben von Behring Milzbrandbazillen, Cholera- und Diphtheriebakterien und Streptokokken von einer 0,5 %igen Phenol-Lösung in einigen Stunden abgetötet, bei 1,5 % bis 2 % dagegen schon in 1 Minute; Staphylokokken in dieser Zeit dagegen erst von einer 2—3 %igen Phenol-Lösung. Robert Koch fand gegenüber den Milzbrandsporen eine nur geringe Wirkung der Karbolsäure; denn 4—5 %ige Lösungen töteten diese Sporen erst in etwa 4 Tagen ab. Nach Schneider werden Staphylokokken von einer 1 %igen Phenol-Lösung in 20—25 Minuten, von einer 1,25 %igen in 10 Minuten abgetötet, und bei einer Phenolkonzentration von 1,5 % erfolgt die Abtötung bereits in 5 Minuten. Im hiesigen Institut werden Staphylokokken-Abtötungswerte des Phenols bei 1,1 % von 10 Minuten, bei 1,2 % von 5 Minuten festgestellt.

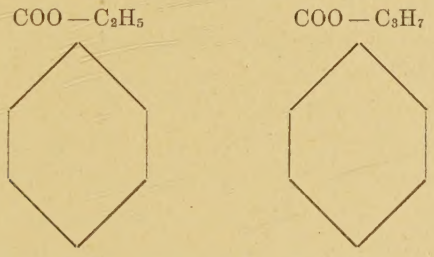
Die Kresole, also die o-, m- oder p-Methylphenol-Verbindungen, haben eine noch bessere Wirkung als das Phenol. Ihre desinfizierende Kraft ist nach Gruber dreimal, nach Hammerl doppelt so stark wie die des Phenols.

Laubenheimer prüfte eine Reihe noch höherer Homologen des Phenols und konnte dabei feststellen, daß Propylphenol in 1 %iger Lösung Staphylokokken bereits in drei Minuten vernichtete. Die Salicylsäure, die Carboxylverbindung des Phenols (o-oxybenzoesäure) ist nach Behring von doppelt so großer Wirkung wie die Karbolsäure. Es ist daher kein Wunder, daß immer mehr die verschiedensten Derivate und Homologen der Phenole in den Bereich der Untersuchungen gezogen werden.

Da sich aber herausgestellt hat, daß das Phenol bei der Wunddesinfektion eine zu starke giftige Nebenwirkung auf den

menschlichen Körper ausübt, so ist man seit vielen Jahren bemüht, Abkömmlinge des Phenols zu finden, denen diese giftige Nebenwirkung fehlt, und die dabei womöglich eine noch bessere Desinfektionskraft besitzen. In dieser Hinsicht bieten die von Sabalitschka hergestellten Ester der p-Oxybenzoesäure gegenüber den Phenolen einen erheblichen Fortschritt. Sie weisen folgende günstige Eigenschaften auf: Vollkommene Geschmack- und Geruchlosigkeit, große Indifferenz gegen Säuren und Basen und weitgehende Unschädlichkeit für Menschen und Tiere.

Von den Estern der p-Oxybenzoesäure zog ich 2, den Aethylester (Nipagin A) und den Propylester (Nipasol) zu meinen Prüfungen heran.



Nipagin A Nipasol

Diese beiden Ester schienen mir besonders geeignet, da sie nach Sabalitschka ziemlich ungiftig sind und von einem Hunde in der 3—4fach größeren Menge vertragen werden als Benzoesäure. So war ferner die tödliche Vergiftungsdosis beim Hunde für 1 kg = 6 g Ester. Im gleichen Verhältnis würden also bei einem 65 kg schweren Menschen erst 390 g Ester vergiftend wirken. Auch Meerschweinchen, die monatelang kleine Gaben von täglich 2,5 mg Nipasol oder Nipagin erhielten, zeigten keinen Unterschied von den Kontrolltieren im Wachstum und im Körpergewicht. Auch der bakterizide Index des Blutes änderte sich nicht, wenn diese Tiere 3 Wochen lang täglich 2—10 mg der Ester als Zusatzfütterung bekamen. Zur Konservierung von Lebensmitteln erwiesen sich diese Ester nach

Sabalitschka ebenfalls sehr geeignet. Denn während früher z. B. Gurken, Rote Rüben, Obstsaft mit 0,2 % freier Benzoesäure konserviert werden mußten, genügen von den genannten Estern bereits 0,08 % (also nur 40 % der Benzoesäure-Menge). In therapeutischen Lösungen, z. B. Seren, wurde schon von 0,1 % Nipagin die Entwicklung der Mikroorganismen stark herabgesetzt; 0,15 % Nipasol tötete in 4 Monaten sämtliche Mikroorganismen ab. Die Ester haben ferner den Vorteil, daß sie in eiweißhaltigen Flüssigkeiten, sofern ihre Lösungsgrenze nicht überschritten wird, keine Fällung bewirken. Wesentlich ist es auch, daß durch den Zusatz der Ester die Wasserstoffionenkonzentration, also der ph-Wert der betreffenden Flüssigkeit, nicht verändert wird.

Die konservierenden Eigenschaften und sonstigen Vorzüge der Ester sind also durchaus günstig zu nennen. Hier interessiert jedoch in erster Linie ihre sterilisierende und desinfizierende Kraft. In dieser Hinsicht sind bereits Versuche von Lockemann gemacht worden, der mit Bact. coli arbeitete und sich dabei der sog. Läppchenmethode bediente. Da nach dem Ausfall seiner Versuche die Ester eine gut desinfizierende Wirkung zeigten, erschien es mir wertvoll, eigene Versuche anzustellen, über die von mir im folgenden Teil berichtet wird.

Durch diese Versuche sollte die entwicklungshemmende und abtötende Wirkung der beiden Ester Nipagin A und Nipasol sowie danach auch ihrer Natriumverbindungen gegen Bact. coli sowie gegen Schimmelpilze und Hefen geprüft werden. Auch sollte ermittelt werden, wieweit sich das Konservierungsmittel zur Konservierung therapeutischer Sera eignete.

Zunächst ergab sich für mich die Aufgabe, eine möglichst starke Lösung des Nipagins und des Nipasols in Alkohol herzustellen. Eine solche 10 %ige Lösung der Ester war zwar klar, sie hatte aber die Eigenschaft, daß sie beim Zusatz zur Bouillonkultur oder beim Verdünnen mit Wasser ausfiel. Es war nicht möglich, aus der 10 %igen alkoholischen Lösung durch Verdünnung mit Bouillon oder Wasser eine 1 %ige Lösung zu erzielen, ohne daß dicke weiße flockige Ausfällungen

entstanden. Aus diesem Grunde wurde versucht, Lösungen geringerer Stärke herzustellen, und zwar folgender Art: Es wurden zugesetzt:

a) Auf 4,75 ccm Coli-Bouillonkultur + 0,25 ccm der obigen alkoholischen 10 %igen Nipagin-Lösung (= 0,5 % Ester-Gehalt). Bei dieser Verdünnung tritt leichte flockige Ausfällung ein.

b) Auf 4,8 ccm Coli-Bouillonkultur + 0,2 ccm der alkoholischen Lösung (= 0,4 % Ester-Gehalt). Auch 0,4 % gibt leichte Ausfällung.

c) Auf 4,9 ccm Coli-Bouillonkultur + 0,1 ccm der alkoholischen Lösung (= 0,2 % Ester-Gehalt). Auch 0,2 % Nipagin ist nicht ohne leichte Ausflockung herzustellen.

d) Auf 4,95 ccm Coli-Bouillonkultur + 0,05 ccm Nipagin-Lösung (= 0,1 % Ester-Gehalt). Auch diese geringe Konzentration ergibt immer noch leichte Trübung, d. h., die normale Trübung der Bouillonkultur wird etwas verstärkt.

Es zeigt sich also, daß das Nipagin zwar in Alkohol sehr gut löslich ist, daß aber diese Lösung, bis zu einer Verdünnung von 0,1 % einer Bouillonkultur zugesetzt, zu Ausfällungen bzw. zu leichten Trübungen führt. Ungeachtet dieser Trübungen wurden diese Lösungen a—d zur Feststellung herangezogen, wieweit die Colibakterien durch die Ester abgetötet wurden. Zu diesem Zweck wurden aus jedem der obigen Coli-Bouillon-Röhrchen nach 2stündiger Einwirkung des Esters je eine Öse in sterile Nährbouillon übertragen und das Röhrchen bei 37° C bebrütet. Nach 24 und 48 Stunden wurde beobachtet, ob Wachstum eingetreten war (Tabelle 1).

Tabelle 1.

Ester-Gehalt in % (Nipagin)	Zeit der Einwirkung	Wachstum
a) 0,5	2 Stunden	—
b) 0,4	2 Stunden	—
c) 0,2	2 Stunden	—
d) 0,1	2 Stunden	+

Aus der Tabelle 1 ergibt sich also, daß die Nipagin-Konzentrationen von 0,2 % bis 0,5 % bei einer 2stündigen Einwirkungszeit die Colibakterien abgetötet hatten, dagegen vermochte die 0,1 %ige Lösung die Colibakterien nicht zu töten.

Weiterhin wurde die keimtötende Wirkung des Nipagins in einem Traubensaft geprüft, welcher durch Penicillium glaucum und Hefe verdorben war. Nach verschiedenen Einwirkungszeiten der zugesetzten Ester wurden die Versuchslösungen auf Bierwürze-Agar und in Bierwürze-Bouillon abgeimpft und eine Woche lang auf Eintritt von Wachstum geprüft. Hierbei zeigte sich, daß bei einem Ester-Gehalt von 0,12 % nach 2 Stunden Abtötung erfolgt war. Bei einer Wiederholung des Versuches ergaben sich die gleichen Resultate. Bei einem dritten Versuche bewirkte nur die Konzentration von 0,18 % Abtötung der Pilze.

Da mit Hilfe der alkoholischen Lösungen keine befriedigenden klaren Lösungen der Ester erzielt werden konnten, so wurde versucht, nach den Angaben von Lockemann und Sabalitschka auf dem Wege über eine Zuckerschmelze zu guten Lösungen der Ester zu gelangen. Zu diesem Zwecke wurde ein Teil Nipagin mit 9 Teilen Glukose durch vorsichtiges Erhitzen zur Schmelze gebracht, sodann nach dem Erkalten in so viel Wasser gelöst, als zur gewünschten Konzentration nötig war. Ich konnte aber auf diese Weise ebenfalls keine gut brauchbaren Lösungen erzielen. Es entstanden Schwierigkeiten dadurch, daß die zähflüssige Schmelze nur heiß pipettierbar war. Auch in der aufgelösten Zuckerschmelze traten beim Herstellen von Verdünnungen Trübungen und Ausflockungen ein. Eine derartige Lösung der Zuckerschmelze mit 0,8 % Ester tötete bei meinen Versuchen Bact. coli in 24 Stunden ab, eine 0,6 %ige Lösung vermochte die Bakterien erst in 5 Tagen zu töten. Ich kann also durch meine Versuche mit der Ester-Zuckerschmelze die günstigeren Ergebnisse von Lockemann nicht bestätigen. Zur Erklärung möchte ich annehmen, daß der aus der Zuckerschmelze entstammende Traubenzucker, der ein sehr guter Nährstoff (Kohlenstoffquelle) für Coli-

bakterien ist, das Wachstum der Bakterien stark gefördert hat, und daß die somit kräftig ernährten Colibakterien der Einwirkung des Desinfektionsmittels besser widerstehen konnten. Außerdem ist damit zu rechnen, daß die immerhin noch ungenügende Lösung der Ester-Zuckerschmelze die bakterizide Wirkung des Esters herabgesetzt hat. Es zeigte sich nämlich, daß nach dem Auflösen der Zuckerschmelze nach kurzer Zeit ein dicker weißer Bodensatz entstand, der nur durch Erwärmung wieder in Lösung gebracht werden konnte, dagegen beim Erkalten sich sofort von neuem bildete. Da auch die vorliegenden Lösungsversuche nicht befriedigend ausfielen, habe ich die Abtötungsversuche mit der Ester-Zuckerschmelze nicht weiter fortgesetzt. Die Frage nach der genauen Größe der abtötenden Wirkung von Nipagin in Zuckerschmelze muß noch offen bleiben.

Wenn die Desinfektionsversuche mit den Estern einwandfrei sein sollen, so müssen die Ester in den gewünschten Konzentrationen restlos löslich sein. Eine besonders gute Wasserlöslichkeit wird den Natriumverbindungen der Ester in der Literatur zugeschrieben. Ich habe daher auch diese Natriumverbindungen der Aethyl- und Propyl-Ester der p-Oxybenzoesäure, die unter dem Namen Nipagin-Natrium und Nipasol-Natrium im Handel sind, zu meinen Abtötungsversuchen herangezogen.

Ich stellte mir daher für die folgenden Versuche ebenfalls eine 10 %ige Lösung dieser Natriumverbindungen der Ester in Wasser her. Es zeigte sich jedoch, daß die 10 %ige Nipasol-Natrium-Lösung in der Wärme zwar leicht löslich ist, dann aber einige Stunden nach dem Erkalten auskristallisiert. Ich habe aus diesem Grunde die Gebrauchskonzentration von 0,1 % bis 1,2 % so schnell wie möglich hergestellt. Die Nipagin-Natrium-Lösung hält sich dagegen bis zu 2 Tagen ohne Ausscheidung.

Aus dieser 10 %igen Stammlösung gewann ich die in den Tabellen aufgeführten verschiedenen Verdünnungen. Die Versuche wurden ebenfalls mit Bact. coli vorgenommen. Den Coli-

Stamm impfte ich auf Agarschrägröhrchen; nach 24stündigem Wachstum bei 37° C wurde davon eine Öse in Nährbouillon übertragen. Diese Bouillonkultur wurde nach 24stündigem Wachstum für die Versuche verwendet.

Bei den Abtötungsversuchen wurde folgende Versuchsanordnung gewählt: Zu fallenden Mengen steriler Nährbouillon wurden in einem sterilen Röhrchen steigende Mengen der 10 %igen Ester-Lösung zugesetzt, und zwar so, daß die Gesamtmenge der Flüssigkeit immer 5,0 ccm betrug. In dieser Weise wurden zu 4,85 ccm, 4,80 ccm, 4,75 ccm und 4,70 ccm Nährbouillon 0,15 ccm, 0,20 ccm, 0,25 ccm und 0,30 ccm der 10 %igen Nipasol-Natrium-Lösung zugegeben, und so Ester-Konzentrationen in Bouillon von 0,3 %, 0,4 %, 0,5 % und 0,6 % erreicht. Zu jedem Röhrchen wurden dann 0,5 ccm der Coli-Bouillon zugesetzt. Nachdem nun das Desinfektionsmittel verschieden lange auf die Colibakterien eingewirkt hatte, wurde eine Rideal-Walker-Öse in sterile Nährbouillon übergeimpft, bei 37° C bebrütet und nach 24 und 48 Stunden geprüft, ob die Bakterien noch vermehrungsfähig oder abgetötet waren. Dies ließ sich durch Wachstumstrübung der Kultur bzw. durch Klarbleiben der Bouillon erkennen. Durch Anlegung von mikroskopischen und Gram-Präparaten wurde festgestellt, daß die gewachsenen Bakterien nicht verunreinigt waren.

Im nachfolgenden sind von den von mir zahlreich angestellten Versuchen nur einige wiedergegeben. Meine ersten Versuche, die hier nicht aufgeführt sind, erfolgten mit verhältnismäßig hohen Nipasol-Natrium-Konzentrationen (0,6—1,2 %), bei denen schon nach 5 Minuten Abtötung erfolgt war. Zwei Wiederholungsversuche hatten dasselbe Ergebnis mit dem Unterschied, daß bei 0,6 % Nipasol-Natrium-Zusatz die Abtötung erst nach 10 Minuten erfolgt war. Da die Versuche günstig ausfielen, wurden sie auch mit geringeren Konzentrationen angestellt, und zwar wählte ich zunächst solche von 0,3 % bis 0,6 % und ließ sie 5 Minuten, 15 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde und 24 Stunden auf Bact. coli einwirken. Das Ergebnis ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2.

Ester-Konzentrationen (Nipasol-Natrium)	Einwirkungszeiten				
	5 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.	24 St.
0,3 %	+	+	+	—	—
0,4 %	+	+	—	—	—
0,5 %	+	—	—	—	—
0,6 %	+	—	—	—	—

Bei einer Nipasol-Natrium-Konzentration von 0,3 % war nach den Einwirkungszeiten von 5 Minuten, 15 Minuten und 30 Minuten noch Wachstum zu sehen, nach 1 Stunde dagegen war Abtötung erfolgt. Bei 0,4 % Ester-Gehalt zeigte sich Abtötung bereits nach 30 Minuten, und Konzentrationen von 0,5 % und 0,6 % ließen schon nach 15 Minuten Abtötung feststellen. Der Wiederholungsversuch zeigte bei 0,5 und 0,6 % Nipasol-Natrium-Gehalt Abtötung schon innerhalb 5 Minuten, nach 10 Minuten auch schon bei 0,3 % und 0,4 %. Dies veranlaßte mich dazu, auch noch geringere Prozentsätze (0,1 % und 0,2 %) des Nipasol-Natriums auf ihre abtötende Wirkung zu prüfen (Tabelle 3).

Tabelle 3.

Ester-Konzentrationen (Nipasol-Natrium)	Einwirkungszeiten			
	5 Min.	15 Min.	30 Min	1 St.
0,1 %	+	+	+	+
0,2 %	+	+	+	—
0,3 %	+	+	+	—
0,4 %	+	+	+	—
0,5 %	+	+	—	—
0,6 %	—	—	—	—
0,7 %	—	—	—	—

Aus diesem Versuch (Tabelle 3) ist ersichtlich, daß eine 0,2 %ige Lösung erst nach 1 Stunde abtötete. Diese Konzentration war die geringste Menge, die noch während der Versuchszeit die Colibakterien absterben ließ. Während in Tabelle 2 die Abtötung der Colibakterien bei 0,5 % Ester-Zusatz bereits

nach 15 Minuten erfolgt war, wurden die Bakterien im Versuch der Tabelle 3 bei gleichen Konzentrationen erst nach 30 Minuten abgetötet; bei 0,6 % erfolgte Abtötung bereits nach 5 Minuten.

Wurden die Versuche anstatt des Nipasol-Natriums mit Nipagin-Natrium ausgeführt, so war selbst nach einer Stunde noch keine Abtötung erfolgt. Es zeigte sich sogar bei weiteren Versuchen, daß das Nipagin-Natrium auch bei einer Versuchsdauer bis zu 24 Stunden in Konzentrationen von 0,1 % bis 0,7 % Bact. coli nicht zu töten vermochte. Aus diesem Grunde erschien es wertvoll, festzustellen, nach welcher Einwirkungsdauer und bei welchen Konzentrationen der Natriumverbindung des Aethyl-Esters eine Abtötung der Colibakterien bewirkt würde. Es wurden dementsprechend die Einwirkungszeiten auf 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 4 Tage und sogar bis auf 10 Tage ausgedehnt. Zum Vergleich wurde in derselben Weise gleichzeitig auch Nipasol-Natrium mitgeprüft.

Tabelle 4.

Abtötungsversuche mit Nipagin-Natrium (abgekürzt = i) und Nipasol-Natrium (abgekürzt = o) mit Bact. coli.

Ester-Konzentrationen	Einwirkungszeiten									
	1 Tag		2 Tage		3 Tage		4 Tage		10 Tage	
	i	o	i	o	i	o	i	o	i	o
0,1 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,2 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,3 %	+	+	+	—	+	—	+	—	+	—
0,4 %	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
0,5 %	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—
0,6 %	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—
0,7 %	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—

Wie die Tabelle 4 zeigt, ist selbst bei den über 24 Stunden hinausgehenden Einwirkungszeiten Bact. coli durch Nipagin-Natrium in Konzentrationen von 0,1 % bis 0,7 % in 48 Stunden nicht abgetötet worden. Erst 0,7 % Nipagin-Natrium ließen bei

einer Einwirkungsdauer von 3 Tagen kein Wachstum mehr aufkommen. Bei 0,5 % Nipagin-Natrium war nach 4 Tagen noch Wachstum festzustellen, bei 0,4 % trat noch nach 10 Tagen Wachstum ein. Erst 0,6 % hatten nach 4 Tagen und 0,5 % nach 10 Tagen die Colibakterien abgetötet.

Die abtötende Wirkung des Nipasol-Natriums dagegen muß als wesentlich besser bezeichnet werden. So töteten 0,3 % Nipasol-Natrium Bact. coli nach 48 Stunden und 0,4 % schon nach 24 Stunden. Es sei noch bemerkt, daß 0,3 % Nipagin noch nicht einmal nach 16 Tagen, sondern erst nach 4 Wochen Bact. coli abgetötet hatten.

Um festzustellen, wieweit sich bei den Grenzkonzentrationen der Ester Schwankungen zeigen würden, impfte ich in dem nun zu beschreibenden Versuch (Tabelle 5) aus jedem mit Nipasol-Natrium und Bact. coli versetzten Röhrchen nicht nur einmal 1 Öse in ein Nährbouillonröhrchen, sondern je 1 Öse in 4 Bouillonröhrchen.

Tabelle 5.

Ester-Konzentrationen (Nipasol-Natrium)	Einwirkungszeiten					
	2½ Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.	24 St.
0,1 %	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
0,2 %	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + — +	— — — —
0,3 %	+ + + +	+ + + +	+ + — +	— — — —	— — — —	— — — —
0,4 %	+ + + +	+ — + —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
0,5 %	+ — — +	— — — +	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
0,6 %	— — — +	+ — — +	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
0,7 %	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
0,8 %	— — + —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
0,9 %	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
1,0 %	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —

Wie aus der Tabelle 5 zu ersehen ist, war bei einer Ester-Konzentration von 0,5 % in 2 ½ Minuten Einwirkungsdauer bereits bei 2 Röhrchen Abtötung zu erkennen, während in den beiden anderen Röhrchen noch Wachstum erfolgte. Bei 0,6 % zeigte sich nur in einem Röhrchen Wachstum. Bei 0,8 % war

das gleiche der Fall. Erst bei 0,9 % war in allen Röhrchen kein Wachstum mehr festzustellen. Bei 5 Minuten langer Einwirkung sind durch 0,4 % die Colibakterien in 2 Röhrchen nicht zum Wachstum gelangt, bei 0,5 % waren 3 Röhrchen steril, bei 0,6 % wiesen noch 2 Röhrchen Wachstum auf, erst ab 0,7 % waren alle 4 Röhrchen steril geblieben. Nach 15 Minuten Einwirkungszeit wurde restlose Abtötung durch 0,4 % erreicht. 0,3 % Ester zeigten in einem der 4 Röhrchen Wachstum, während die gleiche Konzentration bei 30 Minuten langer Einwirkungsdauer zur vollkommenen Abtötung genügte. Bei 0,3 % scheint die praktisch noch wirksame Konzentration des Nipasol-Natriums zu liegen, d. h. der Ester-Konzentration, die noch in 30 Minuten Bact. coli abtötet. Dagegen tötet 0,1 % noch nicht nach 24 Stunden ab. Selbst bei einer Einwirkungsdauer von mehreren Wochen konnte, wie wiederholte Abimpfungen zeigten, 0,1 % Nipasol-Natrium Bact. coli nicht abtöten.

Wenn wir nunmehr die abtötende Wirkung von Nipagin und Nipasol sowie deren Natriumverbindungen mit der Wirkung des Phenols vergleichen, das, wie ich in einem besonderen Versuch ermittelte, in 1,4 %iger Lösung den von mir verwendeten Coli-Stamm in 5 Minuten abtötete, so zeigt sich deutlich, daß die Nipasol-Natrium-Verbindung etwa doppelt so stark wirkt wie das Phenol. Denn wie die Versuche ergaben, töteten Ester-Konzentrationen (als Natriumverbindung) von 0,6 % bis 0,7 % Bact. coli bereits in 5 Minuten ab. Da aber die Nipasol-Natrium-Verbindung noch einen Anteil Natrium im Molekül enthält, so ist die eigentliche Wirkung des Ester-Anteils noch besser.

Wie ich oben bereits Versuche über die Wirkung von Nipagin auf Schimmelpilze und Hefen angestellt habe, so wurde von mir auch in ähnlicher Weise die Abtötungswirkung von Nipasol-Natrium auf Penicillium glaucum und Hefen geprüft. Zu diesem Versuch wurde der gleiche Traubensaft verwendet, der mit diesen beiden Pilzarten stark bewachsen war. Der Traubensaft wurde zunächst durch ein steriles Papierfilter filtriert und dann mit den entsprechenden Ester-Mengen ver-

setzt. Nach bestimmten Zeiten wurde 1 Öse in sterile Bierwürze sowie auf Bierwürze-Agarplatten abgeimpft, täglich auf Wachstum geprüft und nach spätestens 8 Tagen das endgültige Ergebnis abgelesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6.

Abtötende Wirkung von Nipasol-Natrium auf Penicillium glaucum und Hefe in Traubensaft.

Estergehalt (Nipasol-Natrium)	Einwirkungszeiten					
	2½ Min.	5. Min.	15 Min.	24 St.	3 Tage	6 Tage
0,04 %	+	+	+	+	—	—
0,1 %	+	+	+	—	—	—
0,2 %	—	—	—	—	—	—
0,4 %	—	—	—	—	—	—
0,6 %	—	—	—	—	—	—

Aus der Tabelle 6 ergibt sich, daß bei dem außerordentlich geringen Estergehalt von 0,04 % bereits nach 3tägiger Einwirkung die Pilze soweit geschädigt waren, daß sie nicht mehr zum Wachstum gebracht werden konnten. In einer Konzentration von 0,1 % hatte Nipasol-Natrium schon nach 24stündiger Einwirkung die Pilze abgetötet. Der Estergehalt von 0,2 % dagegen hatte die wesentlich bessere Wirkung, daß bereits nach 2½ Minuten Einwirkungsdauer Abtötung erfolgt war. Ein Wiederholungsversuch hatte dasselbe Ergebnis, nur zeigte sich hier bei 0,04 % Esterzusatz Abtötung der Schimmelpilze und Hefen schon nach zweitägiger Einwirkung. Vergleichen wir diese Ergebnisse des Nipasol-Natriums mit der bereits oben beschriebenen Wirkung des Nipagins auf die gleichen Pilze, so ergibt sich, daß 0,18 % Nipagin die Pilze erst bei 2stündiger Einwirkungsdauer abgetötet hatten. Nach diesen Versuchen ist also die Wirkung des Nipasol-Natriums erheblich besser.

Weiterhin wurden auch die Ester-Natrium-Verbindungen daraufhin geprüft, ob sie sich zur Konservierung von haemolytischen Seren und agglutinierenden Seren eigneten, ohne ungünstige Nebenwirkungen auf die Seren auszuüben.

Bei der Prüfung der Ester auf ihre konservierende Fähigkeit gegenüber haemolytischen Seren verfuhr ich wie beim Versuch zur Wassermannschen Reaktion: Es wurde festgestellt, bis zu welcher Verdünnung der Ambozeptor die Hammelblutkörperchen zu haemolysieren vermochte, und zwar einmal ohne Konservierungsmittel und sodann nach Zusatz der Ester. Im ganzen wurden 3 haemolysierende Ambozeptoren geprüft und diese in einer Verdünnung von 1 : 100 angesetzt. Das Meerschweinchen-Komplement wurde wie üblich in 10facher Verdünnung verwendet. Vom Hammelblut wurde nach 3maligem Auswaschen und Zentrifugieren eine 5 %ige Aufschwemmung der Blutkörperchen hergestellt. Bei der Ausführung des Versuchs wurden die Verdünnungen folgendermaßen angesetzt:

1. Einmessung von je 0,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung in Röhrchen 2—6.
2. Sodann werden in Röhrchen 1 und 2 0,5 ccm des haemolytischen Ambozeptors (1 : 100) eingefüllt. Nach guter Durchmischung der in Röhrchen 2 enthaltenen Kochsalzlösung mit dem Ambozeptor werden aus diesem Röhrchen 0,5 ccm in Röhrchen 3 pipettiert, daraus wieder 0,5 ccm in Röhrchen 4 gegeben und so fortgefahren bis Röhrchen 6.
3. Einmessung von je 0,5 ccm Meerschweinchen-Serum (1 : 10) in Röhrchen 1—6.
4. Einmessung von je 1,0 ccm Kochsalzlösung in Röhrchen 1—6.
5. Einmessung von je 0,5 ccm 5 %iger Hammelblutkörperchen-Aufschwemmung in Röhrchen 1—6.

Nach der Herstellung dieser Verdünnungen waren in den 6 Röhrchen folgende Konzentrationen des Ambozeptors enthalten, 1 : 500; 1 : 1000; 1 : 2000; 1 : 4000; 1 : 8000; 1 : 16 000. Die Röhrchen wurden ½ Stunde in einem Wasserbad auf 37° C warm gehalten, während dieser Zeit öfters durchgeschüttelt und darauf die Ergebnisse abgelesen. Der Versuch wurde, wie bereits angegeben, mit drei verschiedenen haemolytischen Seren angesetzt. Es zeigte sich, daß Haemolyse aufgetreten war so-

wohl in Röhrchen 1 wie in Röhrchen 2. In Röhrchen 3 war nur eine sehr schwache Haemolyse festzustellen. Röhrchen 4 bis 6 blieben trüb. Nachdem durch diesen Versuch der haemolytische Titer der 3 Ambozeptoren mit je 1 : 2000 ermittelt worden war, prüfte ich in gleicher Weise, wie hoch der haemolytische Titer der 3 Ambozeptoren war, nachdem ich ihnen einen Zusatz von 1 % Nipasol-Natrium sowie in Parallelreihen von 1 % Nipagin-Natrium gegeben hatte. Der haemolytische Versuch war sonst in derselben Weise wie oben beschrieben angesetzt. Dabei zeigte sich, daß der Titer in allen Fällen wiederum 1 : 2000 war. Der Zusatz der Konservierungsmittel hatte also keinerlei nachteiligen Einfluß auf die haemolysierende Wirkung ausgeübt. Nachdem die konservierten Ambozeptoren 10 Wochen lang im Eisschrank gestanden hatten, wurden die Versuche wiederholt. Die Seren zeigten nach dieser Zeit äußerlich keine Veränderung, und der Titer wurde unverändert wiederum 1 : 2000 gefunden.

Auf Grund dieser Feststellung, daß die Konservierungsmittel Nipasol-Natrium und Nipagin-Natrium auf die haemolytischen Seren keine nachweisbar ungünstigen Wirkungen ausgeübt hatten, wurden auch Versuche zur Konservierung von agglutinierenden Seren unternommen. Als agglutinierendes Serum wurde Paratyphus-B-Serum (Breslau) gewählt, und dieses in normalem Zustande, sowie auch nachdem es 14 Tage lang mit 1 % Nipasol-Natrium bzw. Nipagin-Natrium konserviert gestanden hatte, im Gruber-Widalschen Versuch mit Paratyphus-B- (Breslau) Bakterien-Aufschwemmung geprüft. Hierzu wurden in 9 Blockschälchen fallende Verdünnungen des Breslau-Serums (0,1 ccm) mit Kochsalzlösung (0,9 ccm) angesetzt, und zwar Verdünnungen von 1 : 100; 1 : 200; 1 : 400; 1 : 800; 1 : 1600; 1 : 3200; 1 : 6400; 1 : 12 800; 1 : 25 600. Nach Zusatz der Bakterienaufschwemmung zeigte es sich, daß sowohl in dem nicht konservierten Serum, also ohne Zusatz von Estern, sowie in dem mit 1 % Ester-Natrium-Verbindung konservierten Serum, eine Agglutination bis zur Serumverdünnung von 1 : 12 800 eingetreten war. Es ergibt sich also, daß der Zusatz

der konservierenden Ester bei meinen Versuchen keinen nachteiligen Einfluß auf das agglutinierende Breslau-Serum ausgeübt hatte. Die Wirkung der Natrium-Ester-Verbindung als konservierender Zusatz kann daher als recht günstig bezeichnet werden.

Zusammenfassung.

Nach einem kurzen Rückblick auf die von Robert Koch entwickelten Methoden der Desinfektionsmittelprüfung werden einige neuere Desinfektionsmittel, insbesondere Derivate der p-oxybenzoesäure, besprochen.

Zu eigenen Versuchen wurden die Ester dieser Säure, der Aethyl-Ester Nipagin A und der Propyl-Ester Nipasol sowie ihre Natriumsalze Nipagin-Natrium und Nipasol-Natrium, herangezogen.

Diese Verbindungen wurden auf ihre keimtötende Kraft gegen Bact. coli geprüft. Hierbei ergab sich eine besonders günstige Wirkung des Nipasol-Natriums.

Bact. coli wurde von einer 0,7 %igen Nipasol-Natrium-Lösung in 5 Minuten abgetötet. Den gleichen Abtötungswert hatte eine 1,4 %ige Phenol-Lösung. Die abtötende Kraft des Nipasol-Natriums gegen Bact. coli ist damit doppelt so stark wie die des Phenols.

Auch wurden einige Abtötungsversuche mit Schimmel- und Hefepilzen angestellt. Diese Pilze wurden bereits von einer 0,2 %igen Nipasol-Natrium-Lösung in 2½—5 Minuten abgetötet.

Die Nipagin-Wirkung wurde allgemein wesentlich geringer befunden.

Die Natrium-Verbindungen beider Ester eignen sich auch zur Konservierung therapeutischer Sera, da ihnen die giftigen Nebenwirkungen, wie sie in besonderem Maße die Karbolsäure aufweist, fehlen, und andererseits die Wasserstoffionen-Konzentrationen der Sera durch den Zusatz nicht geändert wird. Es wurden drei haemolytische Sera sowie ein agglutinisierendes Serum (Paratyphus-B-Breslau) geprüft. Die angestellten Versuche ergaben, daß innerhalb der Beobachtungszeit von 10

Wochen bzw. 14 Tagen keinerlei nachteilige Beeinflussung durch den Zusatz von 1% der Ester-Natrium-Verbindungen nachgewiesen werden konnte. Die Sera hatten denselben haemolytischen bzw. agglutinierenden Wirkungswert wie die nicht konservierten Sera.

Herrn Professor Dr. Küster danke ich sehr für die Überlassung dieser Arbeit und für die freundliche Beratung, zu der Herr Professor Küster während der Bearbeitung des Themas jederzeit gern bereit gewesen ist.

Literaturverzeichnis.

Croner, Fr.: Lehrbuch der Desinfektion.

Graßberger, R.: Die Desinfektion in Theorie und Praxis.

Sabalitschka: Chemische Konstitution und Konserverierungsvermögen.

— Die konservierende und desinfizierende Wirkung carboxylischer Säuren, ihrer Salze und Ester.

— Die chemische Konservierung.

— Die Unschädlichkeit der neuen Konservierungsmittel Paraoxybenzoesäure-Aethylester und -Propylester für die Gesundheit.

Cremer, H.: Biologische Versuche mit den Estern der p-Oxybenzoesäure.

Lebenslauf.

Am 11. Mai 1915 wurde ich als zweite Tochter des Pfarrers Arthur G. Müller und dessen Ehefrau Rosalie geb. Gueinzius in Satzung (Erzgebirge) geboren. Von Ostern 1921 bis 1926 besuchte ich die Volksschule, von Michaelis 1926 bis Ostern 1935 die Staatliche Deutsche Oberschule in Grimma (Sachsen). Dort legte ich Ostern 1935 die Reifeprüfung ab. Meinen Arbeitsdienst leistete ich vom 1. August 1935 bis 25. Oktober 1935 in Bautzen ab. Im Wintersemester 1935/36 begann ich das Studium der Medizin in Leipzig. Dort bestand ich nach dem zweiten Semester das Vorphysikum. Im darauffolgenden Wintersemester 1936/37 war ich an der Universität Berlin immatrikuliert, im Sommersemester 1937 und Wintersemester 1937/38 an der Universität Greifswald. Dort legte ich im Anschluß an das 5. Semester das Physikum ab. Vom Sommersemester 1938 bis Sommersemester 1939 studierte ich an der Universität Frankfurt a. M. Im Trimester 1939 und im I. Trimester 1940 war ich an der Universität München immatrikuliert, dort bestand ich am 18. Juli 1940 das Medizinische Staatsexamen. Seit 1. September 1940 bin ich als Pflichtassistentin in der Chirurgischen Abteilung des Diakonissen-Krankenhauses Frankfurt a. M. tätig.

gez. Angelika Müller.